

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003031

International filing date: 23 November 2004 (23.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0089711
Filing date: 10 December 2003 (10.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 16 December 2004 (16.12.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

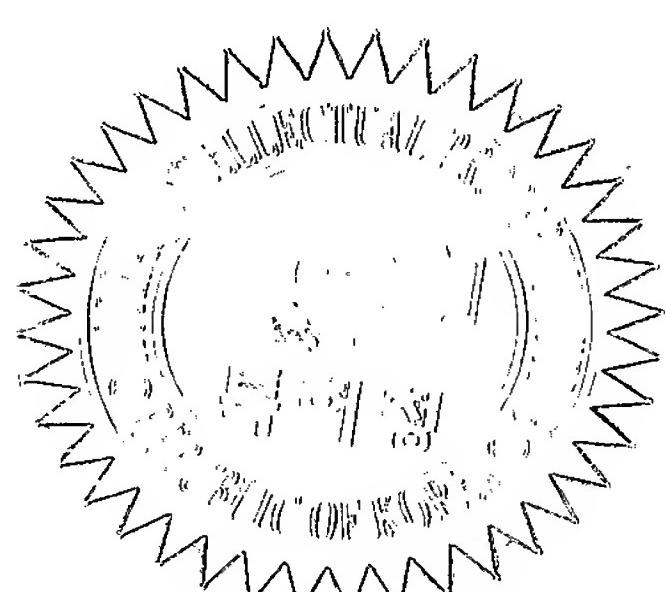
This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0089711
Application Number

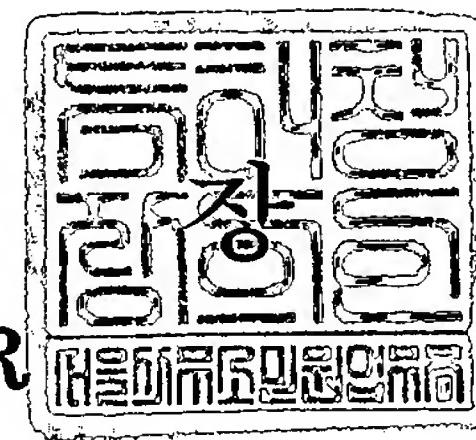
출 원 년 월 일 : 2003년 12월 10일
Date of Application DEC 10, 2003

출 원 인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.

2004 년 11 월 23 일



특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.12.10
【발명의 명칭】	코리네박테리움의 신규 L-스레오닌 유입유전자 및 상기 유전자를 이용한 L-스레오닌 생산균주 개발방법
【발명의 영문명칭】	A Novel L-threonine importer from Corynebacterium and A Preparation method of a strain producing L-threonine
【출원인】	
【명칭】	씨제이 주식회사
【출원인코드】	1-1998-003466-9
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	1999-001584-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박영훈
【성명의 영문표기】	PARK, Young Hoon
【주민등록번호】	511229-1010425
【우편번호】	463-703
【주소】	경기도 성남시 분당구 구미동 무지개대림아파트 111동 102호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임상조
【성명의 영문표기】	LIM, Sang Jo
【주민등록번호】	691110-1149511
【우편번호】	449-845
【주소】	경기도 용인시 죽전2동 501번지 동성1차아파트 103동 1602호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김성준
【성명의 영문표기】	KIM, Seong Jun
【주민등록번호】	570411-1019217

1020030089711

출력 일자: 2004/11/24

【우편번호】	441-390
【주소】	경기도 수원시 권선구 권선동 1235 풍림신안아파트 307-1001
【국적】	KR
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	1
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 이덕록 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	0 항 0 원
【합계】	29,000 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)으로부터 동정한 신규의 L-스레오닌 유입유전자 및 상기 유전자를 L-스레오닌 생산균주를 개발하는데 적용하는 방법에 관한 것으로, L-스레오닌의 발효농도 및 대당수율을 향상시켜 L-스레오닌의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 2

【색인어】

코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), L-스레오닌(L-threonine), L-스레오닌 유입유전자(L-threonine importer), L-스레오닌 생산(L-threonine production)

【명세서】**【발명의 명칭】**

코리네박테리움의 신규 L-스레오닌 유입유전자 및 상기 유전자를 이용한 L-스레오닌 생산
균주 개발방법{A Novel L-threonine importer from *Corynebacterium* and A Preparation method
of a strain producing L-threonine}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 클로닝된 DNA 단편내 유전자 배열을 나타내는 그림이다.

도 2는 대장균 벡터를 이용한 싱글 크로스-오버에 의한 유전자 결손을 나타내는 그림이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <3> 본 발명은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)으로부터 신규의 L-스레오닌 유입유전자를 동정하여 상기 유전자를 L-스레오닌 생산균주 개발에 적용하는 방법에 관한 것이다.
- <4> 이제까지의 아미노산 생산균주 개발방법은 주로 목적 아미노산의 생합성 경로상 유전자의 발현량을 증가시키거나 목적산물에 의한 피드백 저해, 전사 저해 등을 해제시키는 방법과 중앙대사경로상의 유전자를 강화시킴으로써 전구체의 공급을 증가시키는 방법에 의해서 주로 진행되어져 왔다. 즉, 종래의 육종법의 목표는 세포내에 목적으로 하는 아미노산이 과잉으로 생산되어도 그 합성이 저해되지 않고 진행되는 생산균주를 육성하는 것이었다.

<5> 그러나 최근 여러 아미노산에 대한 유입 및 배출 유전자에 대한 연구가 활발히 이루어짐에 따라 이들 유전자를 아미노산 생산균주 개발에 적용하려는 여러 시도들이 있어왔다. 즉, 특정 아미노산에 대한 유입유전자의 결손 혹은 배출유전자의 강화에 의해 세포내의 특정 아미노산의 농도를 감소시킴으로써 생합성 경로상의 여러 효소들이 목적산물에 의한 피드백 저해 및 전사 저해를 받지 않도록 하는 것이다. 배출유전자를 강화시킴으로써 특정 아미노산의 생산성을 증가시킨 사례는 코리네박테리움 글루타미쿰의 라이신 배출유전자(*lysE*)에 관한 보고(*Microbiology*, 147:1765, 2001)와 코리네박테리움 글루타미쿰의 스레오닌 배출유전자(*thrE*)를 대장균에서 발현시켜 스레오닌의 생산량을 증가시킨 보고(*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:205, 2002)등이 있다. 한편, 특정 아미노산에 대한 유입유전자를 결손시킴으로써 생산성을 높인 사례로서는 코리네박테리움 글루타미쿰의 방향족 아미노산에 대한 유입결손 변이균주를 개발함으로써 트립토판의 생산성을 높인 사례(*Biosci. Botech. Biochem.*, 59:1600, 1995)와 대장균에서 스레오닌 유입결손 균주를 개발하여 스레오닌의 생산성을 높인 사례(*Biosci. Botech. Biochem.*, 61:1877, 1997)등이 보고되어 있다.

<6> 이에 따라 본 발명자들은 코리네박테리움 글루타미쿰을 이용하여 스레오닌 생산균주를 개발하는 데 있어, 스레오닌 유입경로를 결손시킴으로써 세포외부에 고농도로 생산된 스레오닌이 세포내로 내유입되는 것을 차단할 경우 세포내의 스레오닌 농도가 낮아지고 이에 따라 스레오닌 생합성 유전자의 스레오닌에 의한 피드백 저해 및 전사저해를 방지할 수 있을 것으로 보고, 유입유전자를 동정하여 이를 결손시키는 방법을 통해 스레오닌 생산균주를 개발하고자 하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <7> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 코리네박테리움 글루타미쿰 야생균주로부터 신규의 스레오닌 유입유전자를 클로닝하여 동정하고, 스레오닌 생산균주의 본 유전자를 결손시킬 경우 스레오닌의 생산성이 증가함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- <8> 따라서 본 발명의 목적은 코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 신규의 스레오닌 유입유전자를 동정하는 것이다.
- <9> 본 발명의 또다른 목적은 상기 유전자의 결손 미생물을 제작하여 스레오닌의 생산성을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <10> 본 발명은 코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 신규의 스레오닌 유입유전자를 동정하는데 관한 것이다. 본 발명은 또한 코리네박테리움 글루타미쿰의 스레오닌 유입유전자 결손균주를 제작하여 스레오닌의 생산성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- <11> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.
- <12> 먼저 스레오닌 유입유전자를 클로닝하기 위한 숙주균주로 이용하기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 스레오닌 유입유전자 결손균주를 제작하였다.
- <13> 이를 위하여 본 발명자들은 스레오닌 저농도 요구성 균주로부터 고농도 요구성 균주를 제작하기로 하였는데, 이는 스레오닌 저농도 요구성 균주의 스레오닌 유입유전자에 결손이 생길 경우 스레오닌에 대한 고농도 요구성 형질을 획득할 것이므로 스레오닌 저농도 요구성 균주

로부터 고농도 요구성 균주를 제작하면 그 균주는 스레오닌 유입유전자 결손균주일 것이라는 판단에 따른 결과였다.

<14> 상기 균주의 제작을 위해서, 당사가 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032를 이용하여 기개발한 스레오닌 영양요구성 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-1을 모균주로 사용하였는데, CJ L-1 균주는 스레오닌에 대해서 20mg/1 정도의 영양요구성을 나타낸다. 상기 CJ L-1 균주로부터 인공돌연변이법에 의하여 스레오닌 500mg/1의 영양요구성을 나타내는 스레오닌 고농도 요구주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-11 균주를 개발하였으며, 상기 균주를 숙주로 하여 코리네박테리움 글루타미쿰의 야생균주인 ATCC 13032의 유전체 라이브러리를 형질전환하여 스레오닌에 대한 저농도 요구성을 회복한 클론을 획득하였다.

<15> 그 후 상기 획득한 클론을 스레오닌 고농도 요구성 균주에 재형질전환하여 저농도 요구성을 회복한 것을 재확인한 후, 클론된 DNA 단편에 어떠한 유전자들이 포함되어 있는가를 확인하기 위하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 그 결과 클로닝된 DNA 단편은 4,846개의 염기를 함유하고 있었으며, ORF Finder 프로그램을 사용하여 DNA 단편내 유전자 코딩부분을 다시 검색한 결과, 길이 1,254 bp의 유력한 막단백질 유전자가 검색되었다. 상기 유전자에 대해서 BLASTP를 이용하여 상동성을 보이는 유전자들을 검색한 결과, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 세린/스레오닌 트랜스포터(serine/threonine transporter)와 48%의 상동성을 보였으며, 박테로이디즈 테타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*)의 Na^+/H^+ -디카르복실레이트 심포터(Na^+/H^+ -dicarboxylate symporter)와는 51%의 상동성을 보임을 확인하였다. 아이크만(Eikmanns) 등의 보고(

Arch. Microbiol., 165:48, 1996)에 따르면 코리네박테리움 글루타미쿰에 있어서 스레오닌은 나트륨 이온과 동시에 세포내로 도입되며 스레오닌과 세린이 공통된 유입유전자에 의해 유입된다고 알려져 있으므로, 본 발명자들은 상기 DNA 단편내에 클로닝된 막단백질 유전자의 산물이 스레오닌 유입유전자일 가능성이 높은 것으로 판단하고 *thrY*로 명명하였다.

<16> 이에 따라 상기 사실을 확인하기 위하여 본 발명자들은 스레오닌 저농도 요구성 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-1 균주의 당유전자를 파괴함으로써 저농도 요구성 균주가 고농도 요구성 형질로 변하는지를 확인하기로 하였다. 유전자의 결손은 상기 유전자의 단백질 코딩 부분의 중간부분만을 DNA 연쇄중합반응(PCR)을 통하여 대장균 벡터로 클로닝한 후, 이를 스레오닌 저농도 요구성 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-1 균주에 형질전환하여 싱글 크로스오버(Single Cross-over)에 의해 결손균주를 제작하는 방법을 사용하였다. 본 방법을 사용하여 스레오닌 저농도 요구성 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-1 균주로부터 *thrY* 유전자 결손균주를 제작하였고, 그 결과 *thrY* 유전자 결손균주의 경우 300mg/l의 스레오닌 고농도 영양 요구성을 나타냄을 확인하였다. 따라서, 상기 결과로 볼 때 본 발명자들이 클로닝한 *thrY* 유전자가 스레오닌의 유입에 관여하는 유전자로 판단되었다.

<17> 한편, 본 발명자들은 실제로 코리네박테리움 글루타미쿰의 스레오닌 생산균주의 *thrY* 유전자를 파괴할 경우 스레오닌 생산에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기로 하였다. 이 때, *thrY* 유전자 결손대상 스레오닌 생산균주로는 당사가 보유하고 있는 스레오닌 생산 코리네박테리움 글루타미쿰 재조합 균주인 CJ T-2를 사용하였으며, 유전자 결손방법은 상기에서 언급한 방법을 사용하였다. 상기 방법으로 제작한 유전자 결손균주를 CJ T-21로 명명하였으며, 상기 균주를 사용하여 실제 스레오닌 생산실험을 진행한 결과, 모균주인 *thrI* 비결손균주 대비 10%의 스레오닌 생산성 향상이 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<18> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 구체적으로 기술한다.

<19> < 실시예 1: 코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 스레오닌 고농도 요구성 균주의 개발 >

<20> 본 발명에서는 먼저 스레오닌 유입유전자를 클로닝하기 위한 숙주균주로 이용하기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 스레오닌 유입유전자 결손균주를 제작하였다. 이를 위해 상기한 바와 같이 스레오닌 저농도 요구성 균주로부터 고농도 요구성 균주를 제작하였다.

<21> 상기 균주의 제작을 위해서 당사가 보유하고 있는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 유래 스레오닌 영양요구성 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-1을 모균주로 사용하였다. 상기 CJ L-1 균주는 스레오닌에 대해서 20mg/1의 영양요구성을 나타내는데, 이를 인공돌연변이시켜 스레오닌 고농도 요구성 균주를 제작하였다. 이 때, 인공돌연변이 유발원으로는 알킬화제의 일종인 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘

(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: NTG)을 사용하였으며, 루리아 버타니 액체배지에서 대수기 중반까지 성장한 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-1을 시트레이트 완충액(pH 5.5)에 $10^7\sim10^8$ 세포/ml로 혼탁시킨 후, NTG의 최종농도가 1,000 μ g/ml이 되도록 한 다음 30°C 진탕기에 서 5분간 처리하였다. 이어서 인산칼륨 완충액(pH 7.0)으로 3회 세척한 후 2,000mg/1의 스레오닌이 함유된 최소배지에 도말하였다. 상기 배지에서 성장한 콜로니 약 30,000개를 20mg/1의 스레오닌이 함유된 최소배지에 투스피킹(tooth picking)하여 성장하지 못하는 균주를 선별하였다. 이렇게 선별된 균주들에 대하여 스레오닌 요구성을 재확인하여 그 중 500mg/1의

스레오닌을 요구하는 균주를 최종적으로 선별, 이를 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-11로 명명하였으며, 스레오닌 유입유전자의 클로닝을 위한 숙주로 사용하였다.

<22> 【표 1】

한천 최소배지

성분	조성
포도당	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
우레아	2g
KH ₂ PO ₄	3.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10mg
MnSO ₄ ·5H ₂ O	10mg
바이오틴	100μg
티아민 HCl	100μg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1g
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	80μg
(NH ₄) ₆ MoO ₂ ·7H ₂ O	40μg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10μg
CuSO ₄ ·7H ₂ O	300μg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10μg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1mg
한천	20g
증류수	1리터당
pH(살균전)	7.0

<23> < 실시예 2: 스레오닌 유입유전자의 클로닝 >

<24> 본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 제작한 스레오닌 고농도 요구성 균주 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-11을 숙주로 하여 코리네박테리움 글루타미쿰 야생균주인 ATCC 13032로부터 스레오닌 유입유전자를 클로닝하고자 하였다.

- <25> 이를 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 염색체 라이브러리를 제작하고, 이를 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-11에 형질전환하여 스레오닌 저농도 요구성이 회복되는 클론을 획득하기로 하였다.
- <26> 염색체 라이브러리를 제작하기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 균주를 루리아 베타니(LB) 배지에서 16시간 배양한 시드(seed) 배양액을 1%의 글리신을 포함한 루리아 베타니 배지 10ml에 접종한 후 12시간 배양하여 균체를 회수한 다음, 큐아젠(QIAGEN) 사의 Genomic DNA Kit을 이용하여 염색체 DNA를 분리하였다. 그 후 2ug의 염색체 DNA에 Sau3A1 제한효소 0.1 유닛을 첨가하여 37°C에서 1시간 배양하여 부분절단 한 후, 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하여 4~6 Kb 크기의 DNA 단편을 분리 정제하였다. 이렇게 정제한 DNA 단편을 코리네박테리움 벡터인 pECCG122의 BamHI 제한효소 위치로 도입하여 염색체 라이브러리를 완성하였다. 그 후 상기에서 제작한 염색체 라이브러리를 스레오닌 고농도 요구성 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-11 균주에 형질전환한 후 스레오닌 20mg/l를 함유한 최소배지에 도말하였다. 그 후 상기 배지에서 생성된 콜로니들로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-11 균주에 재형질전환한 후, 고농도 요구성을 저농도로 회복시키는 클론을 선별하여 pECCG-thrY로 명명하였다.
- <27> < 실시예 3: 클로닝된 DNA 단편의 염기서열 분석 >
- <28> 상기 실시예 2에서 획득한 저농도 요구성 회복 클론내의 유전자를 확인하기 위하여, 적당한 프라이머들을 합성하고 이를 오버랩핑되도록 DNA 시퀀싱을 실시하여 클론된 DNA 단편의 염기서열을 결정하였다(서열번호 1 참조).

- <29> 그 결과 클로닝된 DNA 단편은 4,846개의 염기로 구성되어 있었으며, ORF Finder 프로그램을 사용하여 DNA 단편내 유전자 코딩부분(ORF)를 검색한 결과 길이 1 Kb 이상의 ORF는 두 개가 검색되었다. 즉, ORF1은 [서열번호 1]의 23번 염기부터 1,168번 염기까지의 길이 1,146 bp의 유전자였으며, ORF2는 1,772번 염기부터 3,025번 염기까지의 길이 1,254 bp의 유전자였다(도 1 참조).
- <30> 상기 ORF들에 대해서 BLASTP를 이용하여 상동성을 보이는 유전자들을 검색한 결과, ORF1은 여러 미생물들의 히드록실라아제(hydroxylase) 혹은 모노옥시제나아제(monooxygenase)로 추정되는 유전자들과 높은 상동성을 보였다. 한편, ORF2의 경우는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 세린/스레오닌 트랜스포터와 48%의 상동성을 보이고 있으며, 박테로이디즈 테타이오타오마이크론(*Bacteroides thetaiotomicron*)의 Na^+/H^+ -디카르복실레이트 심포터(dicarboxylate symporter)와는 51%의 상동성을 보임을 확인하였다.
- <31> 이전의 보고에 따르면 코리네박테리움 글루타미쿰에 있어서 스레오닌은 나트륨 이온과 동시에 세포내로 도입되며 스레오닌과 세린이 공통된 유입경로에 의해 유입된다고 알려져 있으므로, 본 발명자들은 상기 DNA 단편내에 클로닝된 ORF2의 유전자 산물이 스레오닌 유입유전자일 가능성이 높은 것으로 판단하고 본 유전자를 *thrY*로 명명하였다.
- <32> < 실시예 4: 스레오닌 저농도 요구성 균주 CJ L-1으로부터 *thrY* 유전자 결손균주의 제작 및 특성확인 >
- <33> 실시예 3의 결과에 따라 본 발명자들이 클로닝한 *thrY* 유전자가 실제로 스레오닌 유입에 관여하는지를 확인하기 위하여, 스레오닌 저농도 요구성 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰

CJ L-1 균주의 *thrY* 유전자를 파괴함으로써 저농도 요구성 균주가 고농도 요구성 형질을 갖게 되는가를 확인하기로 하였다.

<34> *thrY* 유전자의 결손은 본 유전자의 단백질 코딩부분의 중간부분만을 DNA 연쇄증합반응 (PCR)을 통하여 합성한 후 (프라이머1: 5'-GACTTGTCGGTGTGAATCCGAGC-3', 프라이머2: 5'-CGGTCTGATCGCCTACGGAGCAATC-3'), 대장균 벡터인 pCR2.1-TOP0(Invitrogen사)로 클로닝한 후 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-1 균주에 형질전환하여 싱글 크로스오버(Single Cross-over)에 의해 결손균주를 제작하는 방법을 사용하였다(도 1, 2 참조). 이렇게 하여 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ L-1 유래 *thrY* 유전자 결손균주에 대하여 스레오닌 영양요구성을 확인한 결과 스레오닌 요구성이 20mg/1에서 300mg/1로 급격히 증가하는 것을 확인하였다.

<35> 상기 결과로 볼 때, 본 발명자들이 클로닝한 *thrY* 유전자가 스레오닌의 유입에 관여하는 유전자임을 확인할 수 있었다.

<36> < 실시예 5: 스레오닌 생산균주로부터 *thrY* 유전자 결손균주의 제작 및 스레오닌 생산 실험 >

<37> 본 발명자들은 실제로 스레오닌 생산균주의 *thrY* 유전자를 파괴할 경우 스레오닌 생산에 어떠한 영향을 미치는가를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다.

<38> *thrY* 유전자 결손대상 스레오닌 생산균주로는 당사가 보유하고 있는 코리네박테리움 글루타미쿰 재조합 균주인 CJ T-2를 사용하였으며, 유전자 결손방법은 상기한 방법을 사용하였다. 이렇게 하여 제작한 유전자 결손균주를 CJ T-21로 명명하였으며, 상기 균주를 사용하여 실제 스레오닌 생산실험을 진행하였다.

<39> 발효배지의 조성은 하기 표 2와 같으며, 배양온도 30°C, 회전수 230rpm(revolution per minute), 배양시간 72 시간의 배양조건으로 진탕배양기에서 250ml 배플 플라스크(배양액량 25ml)를 사용하여 발효실험을 진행하여 생산된 스레오닌의 농도를 측정하였다. 그 결과 모균주는 7.3g/l의 스레오닌을 배양액 내에 축적시켰으며, *thrI* 유전자 결손균주의 경우는 8.1g/l의 스레오닌을 축적시켜 약 10% 정도의 생산성 향상을 가져옴을 확인하였다. 이는 *thrY* 유전자의 결손에 의해 세포외부에 생산된 스레오닌의 세포내 유입이 차단되어 세포내 스레오닌 농도가 감소함에 따라 스레오닌 생합성 유전자들의 스레오닌에 의한 피드백 저해 혹은 전사저해를 회피한 결과에 따른 것이라 추측된다.

<40> 【표 2】

플라스크 발효배지

성분	조성
당밀(환원당)	100g
효모엑기스	4g
(NH ₄) ₂ SO ₄	40g
우레아	4g
KH ₂ PO ₄	1g
NaCl	2.5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10mg
MnSO ₄ ·5H ₂ O	10mg
바이오틴	100μg
티아민 HCl	200μg
CaCO ₃	40g
공정수	1리터당
pH(실균후)	7.0

【발명의 효과】

- <41> 본 발명은 코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 신규의 스레오닌 유입유전자를 클로닝하여 동정하고, 스레오닌 생산균주의 상기 유전자를 결손시킴으로써 스레오닌 생산성을 증대시키는 방법에 관한 것이다.
- <42> 따라서 본 발명은 향후 코리네박테리움 글루타미쿰을 이용하여 스레오닌 생산균주를 개발하는데 있어 중요한 수단이 될 수 있을 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)에 있어서, 서열번호 1의 DNA 서열 중 1,772번 염기부터 3,025번 염기까지의 연속 DNA 서열로 표시되는 스레오닌 유입 유전자.

【청구항 2】

코리네박테리움 글루타미쿰에서 청구항 1의 스레오닌 유입 유전자를 결손시킴으로써 스레오닌 생산성을 증가시키는 방법.

【청구항 3】

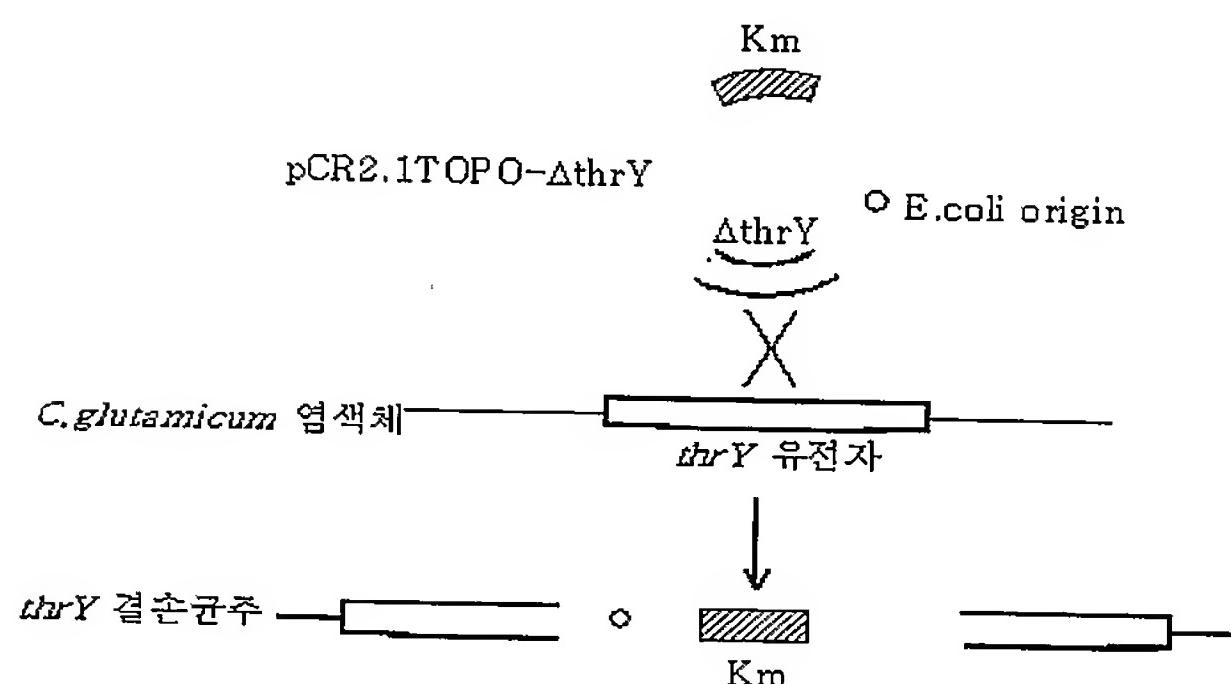
제2항의 방법에 의해 제조된 스레오닌 생산균주.

【도면】

【도 1】



【도 2】



【서열목록】

<110> CJ Corp. <120> A Novel L-threonine importer from Corynebacterium and A

Preparation method of a strain producing L-threonine <160> 1 <170> Kopatent In

1.71 <210> 1 <211> 4846 <212> DNA <213> Corynebacterium glutamicum

ATCC13032 <220> <221> gene <222> (23)..(1168) <223> ORF1 <220> <221>

gene <222> (1772)..(3025) <223> ORF2, novel L-threonine importer (*thrY*) <400>

1 gatcggtccg cacggctggc gaatgctgga atcctgggt ctgctcgacc aaattgtcgt 60

ggccggctac ctcccagaag acatgcagg ccgcgacgct gtcaaccgcg aaaccatcct 120

gaccatgcgt ttcgatgaag aattccagca gcactacggc ggtcgctacc tggtgattca 180

ccgctctgac ctgctcaaca tcctggcac caacgccaa gcagcggcg cgaagctcca 240

caatggcgac ctgggtcacg attcccgac cgtcgacggc ggtatcgagg tggacatcga 300



20030089711

출력 일자: 2004/11/24

atcctccatc aacaaggcg aagataacaa gacttgctt gtgcacgcct tcctgcctt	360
cgacggcatc cactcggtca tgcgaaaaaa gcttgtcgac gacgcccccg tcgcctcctc	420
ctacgtcgcc taccgcccga cctccaagct ggcagaagac gccgaaatga aggacctgaa	480
atccgtcatc ggctacatcg gaccacacgt gcacttcattc caataccac tgccggcgg	540
agaactcctc aatcaggtcg ccgttttga atcccagcgt tacctcgatg gacgcaccgc	600
cggcgacatc ccagaagact gggcaaccc cgaagaatta gaccgcgcct acaaccactg	660
cgacccttc atccaggacc gtctggacac cctgtggcgc aacaactggt ggcaaatgtc	720
cgaccgcgag cctctagaga actggcgtat cggccgcattt ttgctgcttg gcgacgcgc	780
ccacgcaccc ctccagtacc tcgcctcagg cgccgtcatg gccatggaag acgccgaggc	840
tgtcgccctc ttgcgtgccg acgctgcgcg tgctggcaac ctgcattggg aagaggtact	900
cgcagaggtg gaagctgaac gccgaccacg ctgcagccgc atccaaaccg taggcgttt	960
ctggggagag ctctggcatg tggaggcac cgacgtctc atccgcaacg aagtttccg	1020
ccaagcagac cgcaatggct ggtcatcta tgcagactgg ctgtgggtt acgatgcattc	1080
caagcgtgcc cacatcgcca accctgagct cggagaaatg ccacaagcac tgaaggaatg	1140
gcgcgtacgcc ctcctcgaac agaaatagca gcctcacctg ttaaggaaa attgtgtgt	1200
tttcccaggc aggctttta atgtcgagtt cttaagttcg atttcttaac agcgatttca	1260
gtcgaaaaac cggggaaaac cgagcgaaat cgctgttgag aaattgagct tgaggtattg	1320
gaaccatgaa ctcgacaccg taaaatcgca gttaaaaac aaccgcggaa tatggcggtt	1380
taaggcgtcg aggttccgt atgggtgtga gtctaggag agccagttaa ggcccttaga	1440
agcgattctg tgaggtcaaa cttaggaa tctcggtcgt gaattcaccc tttcgaggc	1500
agaccagaca ggcgtgacaa gattggcgaa aaagccgagg tttggcacg tgtgtccgg	1560

ttccaatccc ctaaacaga cagacgtgcc aaaacctggc gaaaatccag attcttgtca	1620
cgcctgtctg gtttctcctt ttgagcgacc caaaccacgc ccgaaccacc gttccacagc	1680
ccccacgaac cctcaagaca gaaaagatcg caccagccgc atcgagctgg tgcgatcaa	1740
ccgcagtaaa aactacagaa aatgcgggtt tctacttgtg atgttccaca tccgatggag	1800
tgatgtcgaa ggcaacgcgg tcgtcttctt cgattcatc tgggaaagtg gtgtgcagct	1860
ggcccttggc gaatttgttc acgatgactg cgattgcgcc gtcgcggtg acgttgctg	1920
cggtgccgaa ggagtcaatc gcgatgtaa cgccgatcat gagggcgact tgttcggtgt	1980
tgaatccgag catggaggcc agcatgccgg ttgctgccat gatggctcg ccggAACgc	2040
ctgggtgcggc gatcatggtg atgcccagca tgaggaggaa tccgatggag aggccgacgc	2100
ctacttccat gtcgtacatg aagacaacag cgaaggtgaa gaggccgatc ttcatcatcg	2160
atccagctag gtggatggtg gcgcacagtg ggacaacaaa gcctgcgacg ttgacatcaa	2220
catcgaaaa caggtctgc tggtaggtca ctggatggt tgccgctgaa gagggatgc	2280
ccagtcgatg gaagtatgca gggagcatgt tttgaacag ttccatggg ttcttcttgg	2340
atactgcacc agcgataatg aactggatgg ctaggaagag cagggtccc acgacggcga	2400
gaatcagtac cttgccaaag gcggacatga tctccaggag gccaccgttc atgccatgc	2460
cgaggaagat gccgaagatg aagagtggca gcagtggat gacaaaggcg gtgatggct	2520
tcatgactac gcgcgtcgagt tcgcggta ccttgaacag ggtgtctgat ttaattacag	2580
ccatgcccaag gccgaggcag aatgccagca gcagtgcggt catcacttca aatggtggtg	2640
gcatctcgat gttgaagtag ggctggaggg cacctgcatt aaggtcgatt tcgggtacgc	2700
tttggtggtc tttcagcagc catggtaga gcgcggta tgctccgtag gcgatcagac	2760
cggagaagac ggtggacgcg taggcattt ctgcaacaat gccgagccat ttgccagcgc	2820

ctcgccgag ccctgcaatg gcggggcga tgagggagaa gatcagcact gggatgaaga	2880
agcccagaaa gttgctgaat aggccgttga aggtggtcaa gatctcagcg agccacaccg	2940
ggaagaagag gctgcagatg attccgagga tcatggcaac gatcactcg aacagcagcg	3000
acgagctcat gctcttatg tccatggttg ttccttattt ctaatcaggt gctgtctgag	3060
caatgctcg cagcgcgtga tggaatttg tgtgcggctt ggaagtgacg ggtcacaagg	3120
acagctcgtg tagaccctgc ctggagcctt gacaaactcc accaaacaac tgcgacgtgt	3180
gtcagattac tgcaggcttgg tggtaaaacc tagttcttgg gaggcggagc atcatacctt	3240
ttaatgtcag gatcgtgcag tgaagaattc agatgaaattt actcgctgaa atattgggtgg	3300
ggatagagtt gttgttatga cggtgatcg aattattctt ggcagcctt ttggcggtct	3360
tgcagtcctt ctcatcgtgg ttggtgctt ggggtggcgc gctaagctcc ctggcaaccc	3420
ggttgtggc attcgtgtcc ctgaggtgcg taaatccaa gaattgtggg atatggcgca	3480
ccgtgtcgct ggcccggtgt gggtgctgtc gggagttcc ttgttattt catcgctagt	3540
tgcgtttgtt gcttctgggtt ggatgtggct tggatggcg ttgggtgttg tggctgccat	3600
cgtgttcatt ggtatgggtg cgggtatggc tgcgcataact gttgcgatgg ttgacgcgaa	3660
gcgcagtcgc gaaaccccgc aggcgcctgt ttccgctgaa attgaagagg ccgggtgggtgt	3720
gactattacc tcgccgatta tcaacaagac tccgctgaat gcccccaaga ttgacttgaa	3780
tgcagtgcgt agagctgcgg aaactacgca agaaccaaaa aatgattaat aattgagaca	3840
agcttcccac tatgtgataa agtcccattt tgtgaataac tcttgtctca gtcaaagcac	3900
ccagtggtgg tggcgcgcta actaagcgag cctgacacacct caagttgttt tcactttgat	3960
gaattttta aggctcgta ttcgttcgac gaagaagcgg gcctttgtg gtttttagcc	4020
cacaaccggc aagccctgga tcgaatgaag ctcgcagcga gtaatttattt gatgttccc	4080

agaaaaggctt cagccccaca atgatttcct cggttaggtgc cccatgagca cgaatcccc	4140
tgtttctcc ctagatgtcc gctatcacga ggatgcttct gcattgtttg cccacttggg	4200
tggcacaacc gcagatgatg cagccctgtt ggaaagcgct gatatcacca ccaagaatgg	4260
tatttcttcc ctcgcggtgt tgaagagttc ggtgcgcatt acgtgcacgg gcaacacggt	4320
ggtaacgcag ccgctgacgg actcgggtag ggcagtggtt gcgcgcctaa cgcagcagct	4380
tggccagtac aacaccgcag agaacacacctt tagttcccc gcctcagatg cggttgatga	4440
gcgcgagcgc ctcaccgcac caagcaccat cgaagtgctg cgcaagttgc agttcgagtc	4500
cggctacagc gacgcgtccc tgccactgct catggcggt ttgcgtttg atttcttaga	4560
aaccttgaa acgctcccg ctgtcgagga gagcgtcaac acttaccccg attaccagtt	4620
cgtcctcgcg gaaatcgtcc tggacatcaa tcaccaggac cagaccgcca aactcgccgg	4680
cgtctccaac gccccaggcg agctcgaggc cgagctcaac aagcttcat tgcttatcga	4740
cggccccc cccgcaaccg aacacgccta ccaaaccacc cctcacgacg ggcacactct	4800
tcgcgttgc gctgatattc ccgatgctca gttccgcacc cagatc	4846

